

黄精多糖的提纯、硫酸化和羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究

张遥遥, 张梦, 胡悦, 任建武*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:以黄精为原料,采用超声辅助法提取黄精多糖,经 DEAE-52 纤维素层析及葡聚糖凝胶层析柱 Sephadex G-200 分离纯化,得到平均分子量为 21.58 kDa 的纯黄精多糖(PSP1-A),浓硫酸法制备硫酸酯化多糖(SPSP1-A),氢氧化钠-一氯乙酸体系法制备羧甲基化多糖(CPSP1-A)。通过傅里叶红外光谱法对衍生物进行结构验证,并采用体外实验法对比修饰前后黄精多糖的抗氧化活性。结果表明,黄精多糖提纯修饰后得到取代度为 1.44 的硫酸化产物和取代度为 0.49 的羧甲基化产物。在最大浓度 10 mg/mL 时,CPSP1-A 对 DPPH·和·OH 的清除率分别为 74.69% 和 91.27%。与 PSP1-A 相比,CPSP1-A 对 DPPH·和·OH 清除力提高,还原力增强,但对 ABTS⁺ 自由基清除力下降;而 SPSP1-A 对以上三种自由基的清除作用均增强,10 mg/mL 时对 DPPH·、·OH 和 ABTS⁺ 的清除率分别为 98.70%、95.72% 和 97.87%,且还原力明显提高,在 10 mg/mL 时,SPSP1-A 还原力是 PSP1-A 的三倍多。结果表明,两种修饰均是提高黄精多糖抗氧化能力的有效方法。

关键词:黄精多糖,硫酸化修饰,羧甲基修饰,抗氧化活性

Purification, Sulfation Modification and Carboxymethylation Modification of Polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* and Its Antioxidant Activity

ZHANG Yao-yao, ZHANG Meng, HU Yue, REN Jian-wu*

(College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Using *Polygonatum sibiricum* (PS) as raw material, ultrasound-assisted extraction was utilized to extract polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* (PSP), then the polysaccharides were purified by DEAE-52 cellulose chromatography and Sephadex G-200, pure polysaccharides (PSP1-A) were obtained. Sulfated polysaccharides (SPSP1-A) was prepared by concentrated sulfuric acid method, and carboxymethylated polysaccharide (CPSP1-A) was prepared by sodium hydroxide-monochloroacetic acid system. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to verify the structure of the derivatives, and the antioxidant activity of PSP1-A before and after modification was compared by *in vitro* experiments. The results showed that the sulfated polysaccharides with a degree of substitution of 1.44 and the carboxymethylated polysaccharides with a degree of substitution of 0.49 were obtained. At the maximum concentration of 10 mg/mL, the scavenging rates of DPPH· and ·OH of CPSP1-A were 74.69% and 91.27%, respectively. Compared with the unmodified PSP1-A, CPSP1-A improved DPPH· and ·OH removal activity, enhanced reductive power, but reduced ABTS⁺ free radical scavenging activity while SPSP1-A enhanced scavenging effects on the above three free radicals, the scavenging rates of DPPH·, ·OH and ABTS⁺ at 10 mg/mL were 98.70%, 95.72% and 97.87%, respectively, and the reducing power was significantly improved, the SPSP1-A reducing power was more than three times that of PSP1-A at the concentration of 10 mg/mL. Both modifications were effective ways to improve the antioxidant capacity of PSP1-A.

Key words: polysaccharides from *Polygonatum sibiricum*; sulfation modification; carboxymethyl modification; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)21-0045-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.008

引文格式:张遥遥,张梦,胡悦,等.黄精多糖的提纯、硫酸化和羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2019,40(21):45-51.

收稿日期: 2019-01-09

作者简介:张遥遥(1994-),女,硕士研究生,研究方向:天然产物加工, E-mail: 18234487912@163.com。

* **通讯作者:**任建武(1967-),男,博士,教授,研究方向:天然产物加工, E-mail: jianwur@sina.com。

基金项目:高校科技园北林生态产业发展战略专项“北京平原造林地块林药配置模式及药食同源产品研发”(BLR1001)。

黄精 (*Polygonatum sibiricum*, PS) 是我国传统中草药, 且药食两用。黄精性平、味甘, 具有滋阴润肺、健脾之功效^[1], 包含多糖、皂苷、黄酮、醌类、生物碱、木质素和人体必需氨基酸等有效成分^[2]。多糖是黄精主要活性成分之一, 研究发现黄精多糖有调节免疫力^[3-4]、抗肿瘤^[5-6]、降脂降糖^[7]、抗炎抑菌^[8]等功效。

多糖结构修饰是引入官能团、提高多糖生物活性甚至使其产生新活性的有效手段, 常见的化学修饰方法包括六种: 硫酸化、磷酸化、乙酰化、烷基化、磺酰化和羧甲基化^[9]。多糖的结构修饰已在黑木耳多糖^[10]、银耳多糖^[11]、茶多糖^[12]、青钱线柳多糖^[13]等中得到研究, 但关于黄精多糖结构修饰的研究很少, 梁引库等^[14]采用三种方法制备硫酸酯化黄精多糖, 修饰前后均具有较好的抗氧化活性; Yelithao 等^[15]得到取代度分别为 0.50、0.94 和 1.90 的三种硫酸化衍生物, 并证实硫酸化黄精多糖有助于激活自然杀伤细胞。现有研究主要是黄精多糖硫酸化修饰, 未见羧甲基修饰的相关报道。

本文对黄精多糖进行硫酸化及羧甲基化两种结构修饰, 并对比修饰前后抗氧化活性的变化, 以期对多糖构效关系的进一步研究提供思路, 并为开发潜在功能性食品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄精 采自北京怀柔区, 2017 年 10 月; DEAE 纤维素、葡聚糖凝胶 Sephadex G-200 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖、无水乙醇、三氯乙酸、浓盐酸、浓硫酸、硫酸铵、氯乙酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、DPPH、ABTS、过硫酸钾、铁氰化钾、无水氯化铁、水杨酸、七水合硫酸亚铁、双氧水 以上均为分析纯, 国药集团北京化学试剂公司。

TL-650Y 型超声波细胞粉碎机 江苏天翎仪器有限公司; 新世纪 T6 紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; TGL16M 台式高速低温冷冻离心机 上海赫田科学仪器有限公司; DTQC-10A 水浴恒温振荡器 北京普析通用仪器有限公司; 85-2 数显恒温磁力搅拌器 金坛市华城润华实验仪器厂; Spectrum400 红外光谱仪 美国 PERKIN ELMER 公司; R-210 旋转蒸发器 瑞士步琪公司; FA2004 型分析天平 上海上平仪器有限公司; DZF 真空干燥箱 上海龙跃仪器设备有限公司; BS-100A 自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; DHG-9033B5 电热恒温鼓风干燥箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; 800Y 小型粉碎机 永康市铂欧五金制品有限公司; LGJ-10N 普通型真空冻干机 北京亚星仪科技发展有限公司; L100-1S-1 型恒流泵 兰格恒流泵有限公司; Shodex SB-806M 示差折光检测器 北京京时代科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黄精多糖的提取 参照骆文灿^[16]的方法, 取筛选后鲜黄精, 清洗去须切片, 于 40 ℃ 电热恒温鼓风干燥箱中干燥 12 h, 粉碎后过 60 目筛, 粉末常温

干燥保存。取 200 g 黄精粉, 按 20:1 (mL/g) 的液料比加入蒸馏水 800.0 mL, 设定超声功率 180 W, 超声时间 60 min 进行超声提取, 然后 40 ℃ 水浴 15 min。以 8000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液经三氯乙酸法脱蛋白得洗脱液, 60 ℃ 旋蒸至一定体积, 加五倍体积无水乙醇在 4 ℃ 冰箱醇沉 14 h, 经 8000 r/min 离心后得到多糖沉淀, 真空冻干, 得到粗多糖粉末。

1.2.2 多糖含量测定 参照 2015 年版《中国药典》, 采用苯酚-硫酸法。即以葡萄糖为标准样品, 配制 90 μg/mL 溶液。分别在 6 支试管中加入葡萄糖标液 (0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL), 加水到 1.0 mL, 分别向其中加入 1.0 mL 苯酚溶液 (5%, W/V), 5.0 mL 浓硫酸, 使总体积为 7.0 mL, 摇匀后沸水浴 20 min, 后立即冰浴 5 min, 在 488 nm 处测定吸光值, 绘制标准曲线。

1.2.3 黄精多糖的纯化

1.2.3.1 DEAE-52 纤维素柱层析 填料进行预处理、装柱后, 称取黄精粗多糖粉末 500 mg 溶于 10.0 mL 蒸馏水中, 离心 (8000 r/min) 除不溶物, 过 0.45 μm 滤膜得到上清液, 用吸管缓慢上样。分别以两倍柱体积的蒸馏水、0.2 和 0.5 mol/L NaCl 洗脱液进行洗脱。恒流泵调节流速为 1.0 mL/min, 自动收集器收集流出液, 每管 10.0 mL。苯酚-硫酸法跟踪检测每管糖含量, 收集单峰对应的管内溶液, 浓缩冻干。重复蒸馏水洗脱操作, 富集得率最高的蒸馏水洗脱部分 PSP1, 按 1.2.1 方法浓缩、醇沉、离心、冻干, 进行下一步纯化。

1.2.3.2 葡聚糖凝胶层析 取经过 DEAE-52 分离后的多糖 100 mg, 溶于 2.0 mL 蒸馏水中, 以脱气后蒸馏水作为洗脱液上样洗脱。恒流泵调节流速为 1.0 mL/min, 自动收集器每管收集 10.0 mL, 苯酚-硫酸法跟踪检测每管糖含量, 收集单峰对应的管内溶液, 浓缩冻干, 得到纯化多糖 (PSP1-A), 重复蒸馏水洗脱操作, 富集多糖。并于室温放入以五氧化二磷为干燥剂的干燥器中保存。

1.2.4 黄精多糖纯度鉴定

1.2.4.1 PSP1-A 的紫外全波长扫描分析 取 10 mg PSP1 粉末, 加蒸馏水制备成 1.00 mg/mL 溶液。取适量溶液于 190~900 nm 范围内进行紫外全波长扫描, 蒸馏水调零, 绘制紫外全波长扫描图。

1.2.4.2 PSP1-A 的分子量测定 采用高效凝胶渗透色谱法测定纯化多糖的分子量。流动相: NaCl、Na₂HPO₄ 水溶液; Mw 测量范围: 500~109 Daltons; 柱温: 25 ℃; 流速: 0.8 mL/min; 色谱柱: SB-802.5HQ; 检测器: Shodex SB-806M 示差折光检测器; 进样量: 100 μL。

以去离子水为溶剂, 真空抽滤处理对去离子水进行过滤和脱气。以处理后的溶剂配制待测样品溶液。取 10 mg 多糖 PSP1, 加水使待测液浓度为 2.00 mg/mL, 在室温下静止过夜, 使粉末充分溶解, 可轻微摇动样品以促进溶解但不可剧烈摇动。样品溶解后, 采用一次性微孔滤膜 (孔径 0.2 μm) 对样品溶液进行过滤, 取过滤后样品注入凝胶色谱柱中, 根据 ParSEC Chromatography Software 软件计算相对分

子量。

1.2.5 黄精多糖的硫酸化修饰 参照梁引库等^[14]的研究,量取 4.0 mL 正丁醇置于冰浴锥形瓶中,加入磁石磁力搅拌,向其中缓慢加入浓硫酸 12.0 mL,搅拌 5 min 后加入 300 mg 硫酸铵。搅拌 10 min 混匀后向其中加入 800 mg 纯化多糖,并搅拌反应 30 min。反应结束后立即以 2.5 mol/L NaOH 溶液调至 pH 为 7.0,4000 r/min 离心 15 min,取上清用蒸馏水透析 3 d,每 4 h 换一次水。透析后溶液浓缩,五倍无水乙醇醇沉,8000 r/min 离心后收集沉淀,真空冷冻干燥,得到硫酸化多糖(SPSP1-A)。

1.2.6 黄精多糖的羧甲基化修饰 参照 Machová 等^[17]的研究,精确称取纯化多糖 500 mg,使其充分溶解于 38.0 mL 质量分数为 20% 的 NaOH 溶液中,30 ℃ 恒温振荡搅拌 60 min。向反应体系中加入 6% 氯乙酸(W/V,无水乙醇溶解)50.0 mL,充分搅拌均匀后,55 ℃ 恒温水浴振荡器中反应 5 h。冷却至室温后以 2.0 mol/L HCl 调节溶液 pH 至中性,透析袋透析 3 d(每 4 h 换一次蒸馏水),浓缩醇沉,真空冷冻干燥,得到羧甲基化多糖(CPSP1-A)。

1.2.7 取代度的测定

1.2.7.1 硫酸基取代度(DS)的测定 采用氯化钡-明胶比浊法^[18]测定硫酸基的取代度。硫酸基标准曲线 称取 2 g 明胶加 400.0 mL 蒸馏水溶解,于 4 ℃ 冰箱中静置 12 h 得到明胶溶液(I)。称取 1 g 氯化钡溶解于 200.0 mL 明胶溶液中得到氯化钡-明胶溶液(II),4 ℃ 保存备用。称取 60 mg 硫酸钾,以 1.0 mol/L 盐酸溶液定容至 100.0 mL 得到硫酸钾标准液(0.60 mg/mL)。分别用移液枪吸取 20、60、100、140、180、200 μL 标准液于 6 支试管中,加 1.0 mol/L 盐酸溶液补至 200 μL(200 μL 盐酸溶液为空白对照),再加入 3.8 mL 8% 的三氯乙酸溶液(W/V,蒸馏水溶解),摇匀后加入 1.0 mL II 液,充分混匀室温下静置 20 min,360 nm 处测得吸光值 A_1 。将 II 液换为 I 液重复上述操作,测得吸光值 A_2 。以硫酸根浓度为横坐标, $A_1 - A_2$ 差值为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.7.2 SPSP 取代度测定 取 10 mg SPSP 粉末于试管中,加入 1.0 mL 1.0 mol/L 盐酸溶液并于沸水浴中反应 5 h,按照标准曲线中的方法测定硫酸基取代度,并按以下公式计算:

$$S(\%) = \frac{CV}{W} \times 100$$

$$DS = \frac{162 \times S\%}{3200 - 102 \times S\%}$$

式中: S 为 SPSP1-A 中硫酸根离子含量,% ; C 为 SPSP1-A 溶液浓度,mg/mL; V 为 SPSP1-A 溶液体积,mL; W 为 SPSP1-A 粉末质量,mg。

1.2.7.3 羧甲基化取代度的测定 根据 Wang 等^[19]的方法,称取 CPSP 粉末 50 mg 置于烧杯中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 2.0 mL,并搅拌混匀,使多糖完全溶解,再用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液进行滴定,根据 pH 达到 2.1 和 4.3 时所需碱液体积 V_1 、 V_2 ,按以下公式计算取代度,公式如下:

$$A = \frac{V_2 - V_1}{M} \times C$$

$$DS = \frac{0.203A}{1 - 0.058A}$$

式中: M 为 CPSP1-A 质量,g; C 为 NaOH 浓度, mol/L。

1.2.8 红外光谱分析 分别取 PSP1-A、SPSP1-A、CPSP1-A 粉末各 10 mg,鼓风干燥箱中 40 ℃ 烘干 24 h,将样品粉末与适量溴化钾晶体混合,在玛瑙研钵中研磨均匀,压成 1 mm 薄片,使用红外光谱仪测定 4000~400 cm^{-1} 波段样品的红外吸收。

1.2.9 抗氧化活性测定

1.2.9.1 清除 DPPH 自由基能力 根据 Eskandari 等^[20]的方法稍作改动,取 5 支洁净试管,依次向其中加入 1.0×10^{-4} mol/L 的 DPPH-乙醇溶液 2.0 mL, 0.2 mol/L pH = 7.0 的磷酸盐缓冲液 1.0 mL,待测样品(2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mg/mL) 2.0 mL。混匀后室温下避光处反应 30 min,在 517 nm 处测得反应后吸光值 A_1 ,以无水乙醇代替 DPPH 得到吸光值 A_2 ,以蒸馏水代替多糖样品溶液得到吸光值 A_0 ,并以稀释 100 倍的 V_c 溶液(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL)作阳性对照。

DPPH 自由基清除率计算公式:

$$R(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中: A_1 为不同浓度样品(PSP1-A、SPSP1-A、CPSP1-A、 V_c)溶液的吸光值; A_2 为无水乙醇代替 DPPH 的参比对照吸光值; A_0 为蒸馏水代替样品的空白对照吸光值。

1.2.9.2 清除 ABTS⁺ 自由基能力 根据 Wootton-Beard 等^[21]的实验方法稍作改动,取 10.0 mL ABTS 溶液(7.0 mmol/L)与 10.0 mL 过硫酸钾溶液(15.0 mmol/L)混匀,在 4 ℃ 冰箱中避光反应 16 h,实验前用 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液进行稀释,使反应液的吸光值在 734 nm 处达到 0.70 ± 0.02 ,得到 ABTS 工作液。取 5 支洁净试管,依次向其中加入 ABTS 工作液 2.0 mL,待测样品(2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mg/mL) 0.2 mL,混合均匀,室温下避光反应 20 min,测定 734 nm 处吸光值 A_1 ,以蒸馏水代替多糖样品得到吸光值 A_0 ,并以稀释 100 倍的 V_c 溶液(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL)作阳性对照。

ABTS 自由基清除率计算公式:

$$R(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_1 为不同浓度样品(PSP1-A、SPSP1-A、CPSP1-A、 V_c)溶液的反应后吸光值; A_0 为蒸馏水空白组吸光值。

1.2.9.3 清除羟基自由基能力 采用水杨酸比色法,根据侯令^[22]的研究稍作改动,取 5 支洁净试管,依次向其中加入 9.0 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 0.5 mL,待测样品(2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mg/mL) 2.0 mL, 9.0 mmol/L 硫酸亚铁溶液 0.5 mL,蒸馏水 6.5 mL,最后加入 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液 0.5 mL,在 37 ℃ 恒温水浴锅中水浴反应 30 min,测定 510 nm 处吸光值

A_1 ,以蒸馏水代替硫酸亚铁溶液得到吸光值 A_2 ,取蒸馏水代替样品测得吸光值 A_3 ,并以稀释 100 倍的 V_c 溶液 (0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL) 作阳性对照。

羟基自由基清除率计算公式:

$$R(\%) = \frac{A_3 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100$$

式中: A_1 为不同浓度样品 (PSP1-A、SPSP1-A、CPSP1-A、 V_c) 溶液的反应后吸光值; A_2 为蒸馏水取代亚铁离子的吸光值; A_3 为蒸馏水空白组吸光值。

1.2.9.4 总还原力 参照张荣华等^[23]的研究稍作调整,取 5 支洁净试管,依次向其中加入 1% 铁氰化钾溶液 (W/V) 1.0 mL, pH=6.6 的磷酸盐缓冲液 1.0 mL, 待测样品 (2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mg/mL) 1.0 mL, 混匀后于恒温水浴锅中 50 ℃ 保温 20 min。再向反应液中加入 10% 三氯乙酸溶液 (W/V) 1.0 mL, 混匀后 4000 r/min 离心 10 min 去除沉淀,取上清液 2.0 mL,再依次加入蒸馏水 1.0 mL, 0.1% 氯化铁溶液 (W/V) 0.4 mL, 室温下反应 10 min 后于 700 nm 处测定反应液吸光值。以稀释 100 倍的 V_c 溶液 (0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL) 作阳性对照。

1.3 数据处理

体外抗氧化实验重复 3 次以去除实验误差,数据处理运用 Origin Pro 8.0 及 SPSS 19.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 黄精多糖含量

采用苯酚-硫酸法测得葡萄糖标准曲线图 (图 1), 线性回归方程为 $y = 0.0643x + 0.0041$, $R^2 = 0.9978$, 测得黄精的多糖含量为 $(18.65\% \pm 0.04\%)$ 。

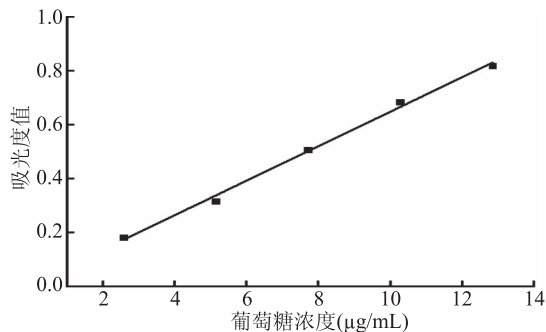


图1 多糖含量标准曲线

Fig.1 Standard curve of polysaccharide content

2.2 黄精多糖的纯化

2.2.1 DEAE-52 纤维素柱层析 黄精粗多糖以蒸馏水、0.2 和 0.5 mol/L NaCl 为洗脱液,经过阴离子交换层析柱,分离得到三个洗脱峰。第一个洗脱峰为蒸馏水洗脱峰,从第 6 管开始收集一直到第 18 管,洗脱液浓缩醇沉冻干后得到多糖粉末,记为 PSP1;第二个洗脱峰为 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱得到的单峰,收集第 24~34 管洗脱液,冻干后得到多糖粉末记为 PSP2;第三个洗脱峰为 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱得到的单峰,收集 46~48 管洗脱液记为 PSP3。重复操作,富集得率最大的蒸馏水洗脱组分用于后续纯化。

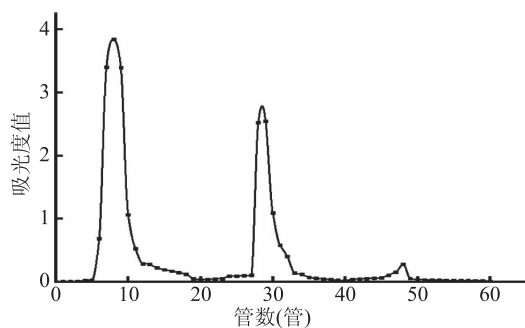


图2 DEAE-52 纤维素离子交换层析

Fig.2 DEAE-52 column chromatogram

2.2.2 葡聚糖凝胶层析 以蒸馏水为洗脱液进一步纯化 DEAE-52 分离所得多糖 PSP1,得到洗脱曲线如图 3。由图可知,凝胶柱洗脱得单一峰,收集 5~16 管洗脱液得到冻干多糖粉末,记为 PSP1-A,重复操作,富集纯化多糖 PSP1-A。

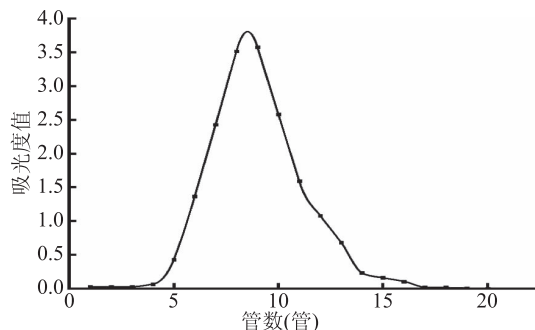


图3 Sephadex G-200 层析洗脱曲线

Fig.3 Sephadex G-200 column chromatographic elution curve

2.3 黄精多糖纯度鉴定

2.3.1 PSP1-A 的紫外全波长扫描分析 PSP1-A 的紫外全波长扫描图如图 4 所示。由图 4 可知,黄精多糖纯化组分 PSP1-A 在 260 和 280 nm 处无吸收峰,说明不含核酸和蛋白质成分,表明粗多糖的除杂效果较好。

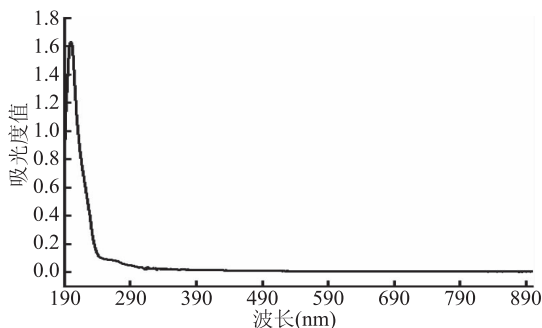


图4 PSP1-A 的紫外可见全波长扫描曲线图

Fig.4 UV-visible full spectrum scan of PSP1-A

2.3.2 PSP1-A 的分子量测定 本实验测得的黄精多糖分子量结果如下,数均分子量 (M_n) 为 12.83 kDa,重均分子量 (M_w) 为 21.58 kDa,分布宽度指数 PD 为 1.68,其 PD 值在小于 1.8,这说明黄精多糖分散性虽大但分布均匀。刘娜^[4]分离得到四种黄精多糖组分,分子量相差很大, M_w 在 2.24~7.74 kDa 范围内,其结果均小于本实验测得的分子量。

表1 PSP1-A 的分子量特性

Table 1 Molecular characterization of PSP1-A

样品	数均分子量 (Mn)	重均分子量 (Mw)	PD 值 (Mw/Mn)
黄精多糖	12.83kDa	21.58 kDa	1.68

2.4 取代度 (DS) 的测定

2.4.1 硫酸基取代度的测定 以硫酸根离子浓度为横坐标, A₁ - A₂ 差值为纵坐标得到标准曲线图(图5), 线性回归方程为 $y = 0.7357x - 0.01122$, $R^2 = 0.9961$, 将 SPSP1-A 的吸光值带入公式中, 得到其硫酸基含量为 14.93%, 取代度为 1.44。

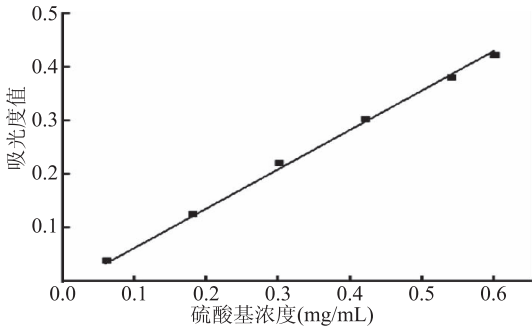


图5 硫酸基含量的标准曲线

Fig.5 Standard curve of sulfonic acid content

2.4.2 羧甲基化取代度的测定 利用黄精多糖在碱性条件下与一氯乙酸反应的方法制得羧甲基化黄精多糖, 根据公式计算出 CPSP1-A 的取代度为 0.49。

2.5 红外光谱分析

修饰前 PSP1-A 及修饰后 SPSP1-A、CPSP1-A 的红外光谱图分别如图 6 所示。PSP1-A 存在多糖特征吸收峰, 分别在 3424、2934、1640、1423、1377、1128、1029、879 和 809 cm^{-1} 处有特征峰。在 3424 cm^{-1} 处有典型较宽的大拉伸峰, 表明存在分子间的 O-H 伸缩振动; 2934 cm^{-1} 的特征吸收峰与饱和 C-H 键伸缩振动有关^[24]; 1640 cm^{-1} 处是由 -OH 弯曲振动引起的; 1423、1377 cm^{-1} 处存在 $=\text{CH}_2$ 变形吸收峰^[25]。研究表明 1200~1000 cm^{-1} 区间内的特征峰与 C-O-C 及 C-O-H 的伸缩振动有关^[26], 该多糖在 1128、1029 cm^{-1} 处有羧基 C-O 的伸缩振动, 证明该多糖为吡喃糖^[27]。多糖在 879 cm^{-1} 处存在特征吸收峰, 且在 $(840 \pm 8) \text{cm}^{-1}$ 处未出现特征吸收峰, 判断该多糖可

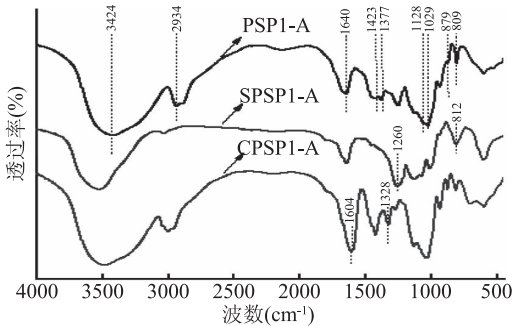


图6 PSP1-A、SPSP1-A、CPSP1-A 的红外光谱

Fig.6 Infrared spectra of PSP1-A, SPSP1-A and CPSP1-A

能主要是 β -型异构体。与 PSP1-A 相比, SPSP1-A 除具备类似 PSP 多糖的特征吸收峰外, 在 1260、812 cm^{-1} 处出现强吸收峰, 分别为不对称 S = O 伸缩振动及 C-O-S 拉伸振动引起的吸收峰^[28], 说明羟基上有硫酸酯基, 硫酸化修饰成功。CPSP1-A 多糖在保留 3415 cm^{-1} 附近 O-H 伸缩振和 2930 cm^{-1} 附近 C-H 键伸缩振动等特征吸收峰的同时, 在 1604 cm^{-1} 处出现 -COOCH₃ 的 C-H 变角振动引起的特征吸收峰, 在 1328 cm^{-1} 处出现 C = O 对称收缩振动引起的特征吸收峰^[29], 由此证明 CPSP 多糖中羧甲基 (-CH₂COOH) 基团的存在, 羧甲基化修饰成功。

2.6 抗氧化活性检测

2.6.1 清除 DPPH 自由基的能力 黄精多糖修饰前后对 DPPH 自由基的清除作用如图 7 所示。

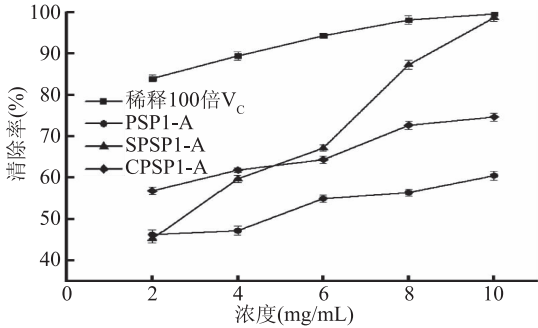


图7 PSP1-A、SPSP1-A 和 CPSP1-A 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.7 Scavenging capacity of PSP1-A, SPSP1-A and CPSP1-A on DPPH free radicals

DPPH 自由基清除实验是常用的体外评估抗氧化活性的方法之一, 抗氧化剂通常通过提供电子或氢原子来中和 DPPH 自由基, 使 DPPH 在 517 nm 处发生颜色变化, 由紫色变为浅黄色。由图 7 可知, 随着反应浓度的增加, 4 种物质对 DPPH 自由基的清除率均随着反应浓度的增加而增加, 且清除 DPPH 自由基的能力均弱于稀释 100 倍浓度的 V_c, 通过 SPSS 软件计算可得 SPSP1-A、CPSP1-A、PSP1-A 的 EC₅₀ 值分别为 2.68、1.33 和 4.72 mg/mL。结合 EC₅₀ 值综合考虑, 硫酸化及羧甲基化均能提高 PSP1-A 清除 DPPH 自由基的能力。文献中, 将黑木耳多糖进行羧甲基化修饰, 修饰后多糖的 DPPH 自由基清除率提高 16.65%^[10], 青钱柳多糖硫酸化后清除作用也显著增强, 多糖浓度为 0.25 mg/mL 时, 其清除率最高可达到 88.09%, 远强于黄精多糖的自由基清除率^[13]。多糖可为 DPPH 自由基提供电子, 使一系列自由基反应终止, 其抗氧化活性可能与多糖及结构组成等因素相关。

2.6.2 清除 ABTS⁺ 自由基的能力 黄精多糖修饰前后对 ABTS 自由基的清除作用如图 8 所示。

ABTS 自由基清除实验是常用的间接抗氧化能力测定方法, 氧化后的蓝绿色自由 ABTS⁺ 可被抗氧化剂还原而褪色。由图 8 可知, 自由基清除率与所测样品浓度之间存在剂量依赖关系, 随浓度增大清除率增大。通过 SPSS 软件计算可得 SPSP1-A、

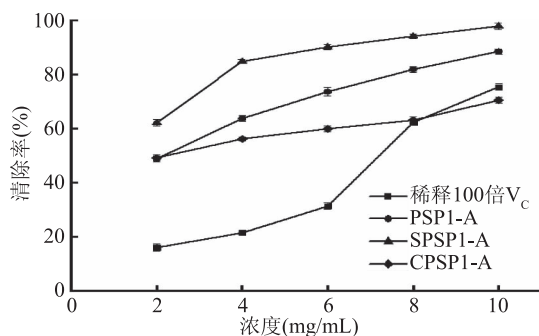


图8 PSP1、SPSP1 和 CPSP1 对 ABTS 自由基的清除作用

Fig.8 Scavenging capacity of PSP1,

SPSP1 and CPSP1 on ABTS free radicals

CPSP1-A、PSP1-A 的 EC_{50} 分别为 1.52、2.33 和 2.26 mg/mL,清除 $ABTS^+$ 自由基的能力均强于浓度稀释 100 倍的 V_c 。各浓度下 CPSP1-A 清除率小于 PSP1-A,说明羧甲基化修饰后,清除 $ABTS^+$ 自由基的能力能力减弱,其机理有待进一步研究。

2.6.3 清除羟基自由基的能力 黄精多糖修饰前后对羟基自由基的清除作用如图 9 所示。

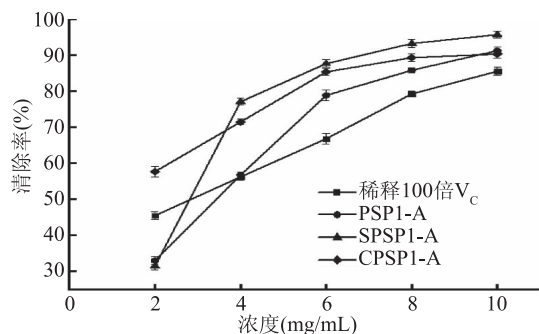


图9 PSP1-A、SPSP1-A 和 CPSP1-A

对羟基自由基的清除作用

Fig.9 Scavenging capacity of PSP1-A,

SPSP1-A and CPSP1-A on hydroxyl radicals

羟基自由基是可以轻易穿过细胞膜造成细胞死亡的高效氧化剂,因此在研究多糖对羟基自由基的清除能力具有重要意义。图 9 显示,SPSP1-A、CPSP1-A、PSP1-A 清除 $\cdot OH$ 的能力与浓度呈正相关,通过 SPSS 软件计算可得 SPSP1-A、CPSP1-A、PSP1-A 的 EC_{50} 分别为 2.65、1.65 和 3.10 mg/mL,结果表明硫酸化、羧甲基化修饰均能增强 PSP1-A 的 $\cdot OH$ 清除活性。青钱柳硫酸化多糖对羟基自由基的清除作用显著增强, IC_{50} 最低值为 0.24 mg/mL,远低于硫酸化黄精多糖,而青钱柳多糖的半抑制浓度为 4.71 mg/mL^[13],活性低于黄精多糖 PSP1-A。

2.6.4 还原力 黄精多糖修饰前后还原力变化如 10 所示。

实验采用铁氰化钾还原法来测定样品的电子供给能力,抗氧化剂可将 Fe^{3+} 复合物还原,从而评估待测样品的潜在抗氧化活性。如图 10 所示,浓度为 6~10 mg/mL 时,所有多糖样品的还原能力均低于浓度缩小 100 倍的 V_c 。PSP1-A 还原力最弱,最大浓度 10.00 mg/mL 时,还原力为 0.299,与 PSP1-A 相比,羧甲基修饰多糖的还原力略微增加为 0.468,此时

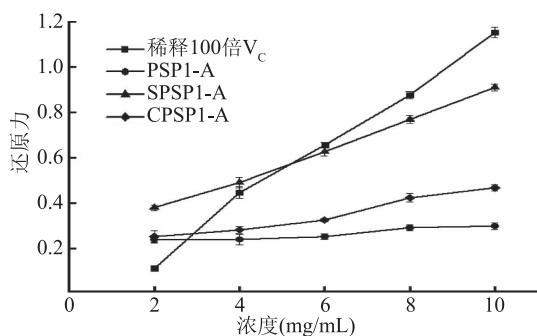


图10 PSP1、SPSP1 和 CPSP1 还原力测定

Fig.10 Reducing power assay of PSP1,SPSP1 and CPSP1

SPSP1-A 还原力为 0.910,远高于羧甲基修饰结果,约为 PSP1-A 还原力的三倍。结果表明羧甲基化修饰可一定程度上提高黄精多糖的还原力,硫酸化修饰能明显增加 PSP1-A 的还原力,所有多糖样品的还原能力均低于 V_c 。这些变化可能与修饰改变多糖空间结构等因素相关。

3 结论

本实验以黄精多糖为研究对象,超声提取的粗多糖,经 DEAE-52 纤维素柱层析对脱蛋白后黄精多糖进行分离,富集含量较高的蒸馏水洗脱组分 PSP1 过葡聚糖凝胶柱后得到均一组分 PSP1-A,紫外光谱证实不含蛋白质及核酸,平均分子量为 21.58 kDa。纯化后进行硫酸化及羧甲基化修饰,得到 SPSP1-A、CPSP1-A 两个修饰产物,取代度 (DS) 值分别为 1.44、0.49。傅里叶红外光谱分析表明两种产物均有多糖特征吸收峰,且 SPSP1-A 成功引入硫酸酯基,CPSP1-A 中也存在羧甲基。体外抗氧化活性研究显示,相同剂量下,SPSP1-A 和 CPSP1-A 清除 DPPH、羟基自由基的能力比 PSP1-A 更明显,还原力也强于 PSP1-A。此外,与 PSP1-A、CPSP1-A 相比,取代度更高的 SPSP1-A 对以上四个抗氧化指标的作用更显著。本实验表明硫酸化和羧甲基修饰是增强抗氧化活性的有效方法,这可能与硫酸基、羧甲基官能团的引入以及引入基团取代度的不同导致的空间变化有关,从而拓宽多糖及其化学修饰衍生物的生物学应用。

参考文献

- [1] 何新荣,刘萍.黄精药理研究进展[J].中国药业,2009,18(2):63-64.
- [2] 王冬梅,朱玮 张存莉,等.黄精化学成分及其生物活性[J].西北林学院学报,2006,21(2):142-145.
- [3] Liu N, Dong Z, Zhu X, et al. Characterization and protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 107:796-802.
- [4] 刘娜.黄精多糖的分离、鉴定及免疫调节功效研究[D].山东:山东大学,2017.
- [5] Long T, Liu Z, Shang J, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF

-κB signaling pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 813–821.

[6] 段华, 王保奇, 张跃文. 黄精多糖对肝癌 H22 移植瘤小鼠的抑瘤作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25 (1): 5–7.

[7] 贾璐, 石洁, 段志倩, 等. 黄精多糖对高脂饲料诱发糖尿病小鼠糖代谢功能的影响 [J]. 中国医药导报, 2017, 14 (8): 24–28.

[8] Li L, Thakur K, Liao B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneura* Hua [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 317–323.

[9] 李玉华, 王凤山, 贺艳丽. 多糖化学修饰方法研究概况 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28 (1): 62–65.

[10] Yang L, Zhao T, Wei H, et al. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49 (5): 1124–1130.

[11] Wang X, Zhang Z, Zhao M. Carboxymethylation of polysaccharides from *Tremella fuciformis* for antioxidant and moisture – preserving activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 526–530.

[12] Wang Y, Peng Y, Wei X, et al. Sulfation of tea polysaccharides: Synthesis, characterization and hypoglycemic activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46 (2): 270–274.

[13] Xie J H, Wang Z J, Shen M Y, et al. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 7–15.

[14] 梁引库, 吴三桥, 李新生. 硫酸酯化黄精多糖抗氧化活性研究 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (2): 254–256.

[15] Yelithao K, Surayot U, Park W J, et al. Effect of sulfation and partial hydrolysis of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* on immune – enhancement [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 122: 10–18.

[16] 骆文灿. 长梗黄精多糖提取、分离纯化及其抗氧化性研究 [D]. 福建: 福建农林大学, 2015.

[17] Machová E, Bystrický P, Maláková A, et al. Preparation and characterization of carboxymethyl derivatives of yeast mannans in aqueous solutions [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 110: 219–223.

[18] Chen Y, Zhang H, Wang Y, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities [J]. Food Chemistry, 2015, 186 (3): 231–238.

[19] Wang J, Zhang L, Yu Y, et al. Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides of *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57 (22): 10565–10572.

[20] Eskandari M, Samavati V. Sono – assisted extraction of alcohol – insoluble extract from *Althaea rosea*: Purification and chemical analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 347–355.

[21] Wootton – Beard P C, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro*, digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin – Ciocalteu methods [J]. Food Research International, 2011, 44 (1): 217–224.

[22] 侯令. 硫酸酯化苹果渣水溶性多糖结构表征和生物活性研究 [D]. 陕西: 陕西科技大学, 2017.

[23] 张荣华, 李诚, 余霞, 等. 猪皮胶原多肽的体外抗氧化特性研究 [J]. 中国酿造, 2012, 31 (7): 117–120.

[24] Su B, Ge B, Li M, et al. Extraction, characterization and deoxy – liquefaction of crude polysaccharide from *Enteromorpha prolifera* to high – quality liquid oil [J]. Fuel, 2019, 237: 763–768.

[25] 夏朝红, 戴奇, 房韦, 等. 几种多糖的红外光谱研究 [J]. 武汉理工大学学报, 2007, 29 (1): 45–47.

[26] Fang X, Yin X, Yuan G, et al. Chemical and biological characterization of polysaccharides from the bark of *Avicennia marina* [J]. European Food Research and Technology, 2015, 241 (1): 17–25.

[27] 陈涛. 3 种仿刺参多糖的提取纯化和抗氧化研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.

[28] Ling Chen, Gangliang Huang. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 743–746.

[29] 孙志涛, 陈芝飞, 郝辉, 等. 羧甲基化黄芪多糖的制备及其保润性能 [J]. 天然产物研究与开发, 2016 (9): 1427–1433.

本刊已被知网、万方、维普、超星全文收录。